

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-49951

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)2月27日

G 01 N 27/26

C-6923-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 電気泳動用媒体の製造方法

⑯ 特 願 昭62-207258

⑰ 出 願 昭62(1987)8月20日

⑱ 発 明 者 杉 原 充 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フィルム株式会社内

⑲ 発 明 者 末 藤 峰 夫 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真フィルム株式会社内

⑳ 出 願 人 富士写真フィルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地

明 細 書

1 発明の名称 電気泳動用媒体の製造方法

2 特許請求の範囲

(1) アクリルアミド系化合物と架橋剤を異なる濃度で含有する2種類の水溶液を、相互の混合比率を漸次変化させながら混合し、前記アクリルアミド化合物と前記架橋剤の濃度の予め定められた漸次的変化を形成しつつ重合開始剤の存在下に架橋重合させて、予め定められたアクリルアミド化合物と架橋剤の濃度勾配(ポリアクリルアミド系水性ゲル濃度グラジエント)を有する電気泳動用媒体の製造方法において、前記異なる濃度の2種類の水溶液の混合前の粘度が実質的に等しいことを特徴とする電気泳動用媒体の製造方法。

(2) 前記2種類の水溶液の相互の粘度差が、混合する2種類の水溶液の粘度の平均(算術平均)値を基準にして、その上下12%以内である特許請求の範囲第1項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(3) 前記水溶液の少なくとも一方に水溶性ポリマーが含まれる特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(4) 前記水溶液の少なくとも一方に変性剤として

陰イオン界面活性剤が含まれる特許請求の範囲第1項ないし第3項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(5) 前記陰イオン界面活性剤がアルキル硫酸塩である特許請求の範囲第4項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(6) 前記アルキル硫酸塩がドデシル硫酸のナトリウム塩又はカリウム塩である特許請求の範囲第5項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(7) 前記電気泳動用媒体が平面状支持体と平面状カバーシートとの間に層状の電気泳動用媒体膜として設けられる特許請求の範囲第1項ないし第6項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(8) 前記支持体と前記カバーシートがいずれもポリエチレンテレフタレートからなるシート状物である特許請求の範囲第7項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

(10) 前記電気泳動用媒体が管状支持体の内部に柱状の電気泳動用媒体として設けられる特許請求の範囲第1項ないし第6項に記載の電気泳動用媒体の製造方法。

以下省略

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は蛋白等の生体高分子成分、又はその他の高分子物質の分離分画分析に用いられるポリアクリルアミド系水性ゲルからなる膜(層)状、柱状(角柱状又は円柱(カラム)状)の電気泳動用ゲル媒体(以下、ゲル媒体又はゲルということがある)の製造方法に関するものであり、さらに詳しくは、電気泳動方向にポリアクリルアミド系水性ゲルの濃度勾配を有する膜状又は柱状のポリアクリルアミド系水性ゲル(グラジエントゲル)をアクリルアミド系化合物(単量体)と架橋剤の濃度の異なる2種類のゲル形成液相互の混合比率を漸次変化させながら混合して製造する方法において、混合される2種類の濃度のゲル形成液の粘度を実質的に等しくした膜状又は柱状の電気泳動用ゲル媒体の製造方法に関するものである。

〔従来の技術〕

近年において、電気泳動分離分画法は生体成分の分離分画分析に多用されており、特に蛋白の分離分画分析は疾病診断のための生化学検査において頻繁に用いられている。

有するポリアクリルアミドゲル電気泳動用媒体膜を、アクリルアミドと架橋剤を含む水溶液の薄層を支持体の表面で電子ビーム等の電離放射線を用いて架橋重合させて製造する方法及び装置が記載されている。この方法に用いられる装置及び濃度勾配をゲル膜中に発現させるための電子ビーム等のコントロール法はきわめて複雑である。また特願昭62-129924に記載の方法等に従ってゲル濃度勾配をもたせたポリアクリルアミドゲル膜(濃度グラジエントゲル膜)を流延塗布して製造する場合には、塗布用水溶液の濃度変化にともなって流延塗布する方向に膜厚の変動を生じたり、泳動像又は泳動パターンの乱れが発生するという欠点があることが判明した。

〔発明の目的〕

本発明の目的は蛋白等の生体高分子成分又はその他の高分子成分の低分子量部分から高分子量部分までほぼ同等な良好な高分離性能を持ち、泳動像又は泳動パターンの乱れの排除されたあるいは乱れの極めて少ないポリアクリルアミド系水性ゲル濃度グラジエントを有する膜状又は柱状(角柱状又は円柱状)のゲル媒体の改良された製造方法

膜又はシート状の電気泳動用媒体としては古くから濾紙が用いられていたが、最近では分離分画性能の良好なアガロース水性ゲル電気泳動用媒体膜やポリアクリルアミド系水性ゲル電気泳動用媒体膜が用いられるようになり、特に分子篩効果を有するポリアクリルアミドゲル膜は現在最も多く利用されている。そして蛋白等の生体成分の高分子量部分まで精度よく分離分画できるポリアクリルアミドゲル膜の要請が高まってきた。

一方、蛋白をその分子量の違いにより1回の電気泳動操作で分離分画分析する場合、通常の濃度一定のポリアクリルアミドゲル膜では、分離分画した蛋白のバンドの間隔が低分子量部分では広く、高分子量部分では狭くなる。このため蛋白の高分子量部分の分離が悪くなる。そこで低分子量部分から高分子量部分まで広い分子量範囲にわたって均等に良好な分離分画性能を得るために、電気泳動方向にポリアクリルアミドゲル濃度又は緩衝液濃度に勾配をもたせたポリアクリルアミドゲル膜(グラジエントゲル膜)が使用されている。例えば特開昭60-235819(EP 0 159 894A)にはポリアクリルアミド濃度(ゲル濃度又は孔径サイズ)勾配を

を提供することである。

本発明の他の目的は蛋白等の生体高分子成分又はその他の高分子成分の分離分画分析に用いられる膜(層)状のポリアクリルアミド系水性ゲル電気泳動用媒体(以下、ゲル媒体膜又はゲル膜という)において、ポリアクリルアミド系水性ゲルの濃度の漸次変化(濃度勾配)に伴う不規則なあるいはコントロールされざる膜厚の変動が排除されたあるいは膜厚の変動が極めて少ないポリアクリルアミド系水性ゲル濃度グラジエントを有するゲル媒体膜の改良された製造方法を提供することである。

〔発明の構成〕

本発明は、アクリルアミド系化合物と架橋剤を異なる濃度で含有する2種類の水溶液を、相互の混合比率を漸次変化させながら混合し、前記アクリルアミド化合物と前記架橋剤の濃度の予め定められた漸次的変化を形成しつつ重合開始剤の存在下に架橋重合させて、予め定められたアクリルアミド化合物と架橋剤の濃度勾配(ポリアクリルアミド系水性ゲル濃度グラジエント)を有する電気泳動用媒体の製造方法において、前記異なる濃度の2種類の水溶液の混合前の粘度が実質的に等し

いことを特徴とする膜状又は柱状(角柱状又は円柱状)の電気泳動用媒体の製造方法である。

〔発明の構成の詳細な説明〕

本発明のポリアクリルアミド系水性ゲル電気泳動用媒体の製造方法は、膜(又は層)状のゲル媒体と柱状(角柱状又は円柱(又はカラム)状)のゲル媒体にほぼ同じく適用できるので、以下においては膜(又は層)状のゲル媒体(ゲル媒体膜)を主にして説明する。

ゲル媒体に用いることができるアクリルアミド系化合物(単量体)の例としては、アクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-(ヒドロキシメチル)アクリルアミド、ジアセトンアクリルアミド等のアクリルアミドホモログがある。これらの化合物は単独で、または2種以上を組合せて用いることができる。これらの化合物のうちではアクリルアミドが好ましく、またアクリルアミドと他のアクリルアミド系化合物の1種以上との併用も好ましい。

架橋剤としては「Electrophoresis」2(4),213-219(1981),同誌 2(4),220-228(1981)等に記載の二官能性架橋剤化合物、特開昭61-2058等に記載

の三官能性以上の架橋剤化合物を用いることができる。二官能性架橋剤の具体例として、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS); N,N'-プロピレンビスアクリルアミド(PBA); ジアクリルアミドジメチルエーテル(DAE); 1,2-ジアクリルアミドエチレングリコール(DEG); エチレンウレアビスアクリルアミド(EUB); エチレンジアクリレート(EDA); N,N'-ジアリルタルタルジアミド(DATD); N,N'-ビスアクリルシスタミン(BAC)がある。三官能性架橋剤の具体例として、1,3,5-トリアクリロイルヘキサヒドロ-s-トリアジン(TAHT); トリアリルシアヌレート(TAC); トリアリルイソシアヌレート(TAIC)等がある。これらの架橋剤のうちでBISとTAHTが好ましい。架橋剤は2種以上を組合せて用いることもできる。

架橋剤の量は、単量体と架橋剤の合計重量に対して約0.5w%から約30w%,好ましくは約1.0w%から約10w%の範囲で用いられる。

ゲル媒体には液の粘度を調整する目的及び他の諸目的でアガロース、水溶性ポリマー(例、水溶性セルロース誘導体、ポリアクリルアミド)の1種類又は2種類以上を添加することができる。

アガロースとしては、特開昭55-5730, 特開昭55-110946, 特表昭57-502098, 特開昭59-126236等に記載の低電気浸透性アガロース、中電気浸透性アガロース、高電気浸透性アガロースのいずれも用いることができる。アガロースの添加量は単量体と架橋剤を含む水性ゲルの容積に対して、約0.1w/v%から約2.0w/v%,好ましくは約0.2w/v%から約1.2w/v%の範囲である。

水溶性ポリマーとしては、特開昭59-126236, 特開昭60-60548等に記載の分子量約1万~約100万の範囲の付加重合型または縮重合型の水溶性の非イオン性ポリマー、特開昭61-18852等に記載のビニルスルホン基等含有の架橋性アクリルアミド系コポリマー、特開昭61-214878に記載の水溶性セルロース誘導体等を用いることができる。付加重合型の水溶性の非イオン性ポリマーの例としてポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンがある。縮重合型の水溶性の非イオン性ポリマーの例としてポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリ-N-ビニルピロリドンがある。架橋性アクリルアミド系コポリマーの例として、N-[[3-(ビニルスルホニ

ル)プロパンアミド]メチル]アクリルアミド-アクリルアミドコポリマー; N-[[3-(2-クロロエチルスルホニル)プロパンアミド]メチル]アクリルアミド-アクリルアミド-N-(1,1-ジメチル-3-オキソプロチル)アクリルアミドコポリマーがある。水溶性セルロース誘導体の例としてメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース等の水溶性セルロースエーテルがある。これらの水溶性ポリマーのうちではポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール、N-[[3-(ビニルスルホニル)プロパンアミド]メチル]アクリルアミド-アクリルアミドコポリマーが好ましい。水溶性ポリマーの添加量は、付加重合型または縮重合型の水溶性の非イオン性ポリマーの場合、単量体と架橋剤の合計重量に対して約2w%から約100w%,好ましくは約5w%から約50w%の範囲、架橋性アクリルアミド系コポリマーの場合、アクリルアミド系化合物の重量に対して約1w%から約50w%,好ましくは約5w%から約40w%の範囲である。

ゲル媒体チレングリコール等のポリオール化合

物を添加することができる。その添加量は水性ゲル媒体の容積に対して約1v%から約40v%の範囲である。

アガロース及び/又は水溶性ポリマーはゲル形成液を調製する時から濃度の異なる2種類のゲル形成液を混合する前までに添加することが好ましい。グリセロール、エチレングリコール等のポリオール化合物をゲル媒体に添加する時期は通常単量体と架橋剤を水に溶解する時からポリアクリルアミド系水性ゲルの形成時(又は管に充填時)までの間何時でもよいが、単量体と架橋剤を水に溶解する時から濃度の異なる2種類のゲル形成液を混合し流延塗布する前(又は管に充填する前)までの間が好ましい。

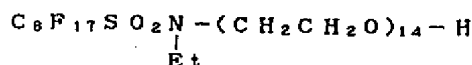
ゲル媒体を蛋白質又は複合蛋白質(例えば、リボプロテイン、グリコプロテイン等)の分離分画分析に用いる場合には、変性剤として陰イオン性界面活性剤を含有させることが好ましいか、又は必須であることが多い。陰イオン性界面活性剤を電気泳動媒体に含有させることにより蛋白質又は複合蛋白質の効率的な分離分画とそれらの分子量測定が可能になる。ゲル媒体を核酸フラグメントの分

離または分取の目的に用いる場合には陰イオン性界面活性剤の添加は不要である。

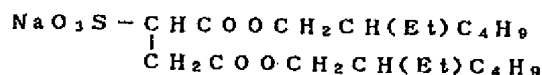
変性剤としての陰イオン性界面活性剤の例としてはアルキル硫酸塩をあげることができ、殊に炭素原子数10以上の長鎖アルキル基を有するアルキル硫酸塩が好ましく用いられる。塩を形成する陽イオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオン、リチウムイオン等のアルカリ金属イオンが一般的であり、これらのうちではナトリウムイオンが用いやすい。アルキル硫酸塩のうちではドデシル硫酸塩(ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等)が好ましく、なかでもドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が最も好ましい。

変性剤としての陰イオン性界面活性剤の添加量は単量体と架橋剤を含む水性ゲルの容積に対して約2.0w/v%以下、好ましくは約0.1w/v%から約1.5w/v%の範囲である。変性剤の添加時期は通常単量体と架橋剤を含む諸成分を水に溶解する時から水性ゲルの形成時までの間が好ましい。

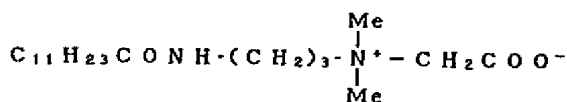
ゲル媒体には変性剤と異なる種類のノニオン性、アニオン性又は両性界面活性剤を添加することができる。界面活性剤の例として、



等のノニオン性界面活性剤、



等のアニオン性界面活性剤、



等の両性界面活性剤がある。界面活性剤の添加量は、単量体と架橋剤を含む水性ゲルの容積に対して、ノニオン性又はカチオン性界面活性剤の場合、約 1×10^{-4} から約 5×10^{-1} w/v%、好ましくは約 1×10^{-3} から約 1×10^{-2} w/v%の範囲、アニオン性界面活性剤の場合、約 1×10^{-4} から約 5×10^{-2} w/v%、好ましくは約 1×10^{-3} から約 5×10^{-2} w/v%の範囲である。

ゲル媒体には電気泳動される試料に応じて電気泳動実施時のpH値を2.5から10.0の範囲内の所望の値に緩衝できる公知のpH緩衝剤から適宜選択して含有させることができる。ゲル媒体を核酸フラグメントの分離又は分取に用いる場合には pH8.0

から10.0、好ましくは8.0から9.0の範囲内の所望のpH値に緩衝できる公知のpH緩衝剤から適宜選択して含有させることができる。

用いるpH緩衝剤としては、日本化学会編「化学便覧 基礎編」(丸善、1966年発行)1312-1320頁; R.M.C.Dawson et al 編「Data for Biochemical Research」第2版(Oxford at the Clarendon Press, 1969年発行)476-508頁;「Biochemistry」5, 487-477頁(1966年);「Analytical Biochemistry」104, 300-310頁(1980年)等に記載のpH緩衝剤組成物がある。

pH2.5-10.0の範囲のpH緩衝剤の具体例として、バルビタールを含む緩衝剤; トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)を含む緩衝剤; 硫酸塩を含む緩衝剤; 硼酸塩を含む緩衝剤; 酢酸又は酢酸塩を含む緩衝剤; 枸橼酸又は枸橼酸塩を含む緩衝剤; 乳酸又は乳酸塩を含む緩衝剤; グリシンを含む緩衝剤; N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine); 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸(HEPPS), Na塩又はK塩等; β -ヒドロキシ-4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸(HEPPSO), Na塩又はK塩

等；3-[[2-ヒドロキシ-1,1-ビス(ヒドロキシメチル)エチル]アミノ]-1-プロパンスルホン酸(TAPS), Na塩又はK塩等；3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸(CAPS), Na塩又はK塩等；及びこれらのいずれかと必要により組合せられる酸，アルカリ又は塩がある。好ましい緩衝剤の具体例として，磷酸二水素カリウム-磷酸水素二ナトリウム；Tris-塩酸；Tris-硼酸ナトリウム；Tris-硼酸ナトリウム-EDTA・2Na塩；Tris-枸橼酸；バルビタールナトリウム-酢酸ナトリウム；バルビタールナトリウム-塩酸；バルビタール-バルビタールナトリウム；酢酸-酢酸ナトリウム；乳酸-乳酸ナトリウム；枸橼酸-磷酸二水素ナトリウム；Bicine；HEPPS；HEPPS・Na塩；HEPPSO；HEPPSO・Na塩；TAPS；TAPS・Na塩；CAPS；CAPS・Na塩等がある。

pH8.0～10.0の範囲のpH緩衝剤の具体例として，Tris；Bicine；HEPPS, Na塩又はK塩等；HEPPSO, Na塩又はK塩等；TAPS, Na塩又はK塩等；CAPS, Na塩又はK塩等；及びこれらのいずれかと必要により組合せられる酸，アルカリ又は塩がある。好ましい緩衝剤系の例として Tris-硼酸-EDTA・2Na塩(pH

8.2～8.3用組成)；Tris-塩酸(pH8.9用組成)；CAPS・Na塩(pH8.9用組成)，Tris-グリシン 等がある。

予め定められた厚さのゲル媒体膜は実質的に無色透明であることが泳動像又は泳動パターンを検出又は読取りに一般的に好ましい。

ゲル媒体膜は，実質的に電気不伝導性で水不浸透性の平滑な表面のシート状(フィルム状，又は平板状)支持体又はカバーシートの上に予め定められた厚さを有する膜又は層として設けられる。実質的に電気不伝導性で水不浸透性の平滑な表面のシート状支持体又はカバーシートとして公知のガラス板，有機ポリマーシート等を用いることができる。有機ポリマーシートの具体例としてポリエチレンテレフタレート，ビスフェノールAのポリカルボネート，ポリスチレン，セルロースエステル(例，セルロースジアセテート，セルローストリアセテート，セルロースアセテートプロピオネート等)等のポリマーからなる厚さ約50 μ mから約2mm，好ましくは約80 μ mから約500 μ mの範囲の透明な，すなわち波長約200nmから約900nmの範囲内の少なくとも一部の範囲の波長の電磁放射線を透過させ

る平滑な表面を有するシート状物又は平板状物がある。有機ポリマー支持体又はカバーシートを用いる場合にはその表面を親水化しゲル膜との接着を良好にするために，紫外線照射，グロー放電処理，コロナ放電処理，火焰処理，電子線照射，ケミカルエッチング，電解エッチング等の公知の表面処理方法を適用することができる。有機ポリマー支持体又はカバーシートの表面には必要に応じて特開昭59-164950，特開昭59-212753，特開昭60-194349，特開昭60-239658，特開昭60-244850，特開昭61-14557等に記載の下塗層又は接着層を設けてその上に設けられるゲル媒体層と支持体又はカバーシートとの接着を強固にすることができる。

濃度の異なる2種類のゲル形成水溶液の混合比率を連続して漸次変化させる方法は，公知の諸種の方法に従って実施することができる。その例として，堀尾，山下編「蛋白質・酵素の基礎実験法」(南江堂，1981年発行)304～308頁，特開昭54-43881に記載されているように，単量体(アクリルアミド系化合物)，架橋剤，重合開始剤の含有量の異なる高低濃度の2種類のゲル形成液をそれぞれ収容する

2個の容器を底面のすぐ上部を導管で連結し，さらに一方の容器底面のすぐ上部から混合液送出導管を結合し，混合液送出導管の接続されている側の容器(低濃度液側又は高濃度液側のいずれか一方)の中の液を攪拌しながら混合液送出導管の途中に設けられているポンプで混合液を送り出す方法；特開昭62-167459に記載されているように，高低濃度の2種類のゲル形成液をそれぞれ収容する2個のゲル形成液収容容器，2種類のゲル形成液を受け入れて混合攪拌する1個の混合攪拌容器，2個のゲル形成液収容容器それぞれから1個の混合攪拌容器に液を輸送する液輸送導管，各液輸送導管の途中に設けられている液輸送流速設定手段，各液輸送流速設定手段を予め定めた流速の漸次変化函数に対応した信号(情報)に従って各液輸送流速に設定するためのコントロール手段，混合攪拌容器から出ている1個の液輸送導管とその先端部に接続されている流延塗布手段を有する装置を用いる方法等がある。また，特開昭62-129924に記載されているように，高低濃度の2種類のゲル形成液の流量比を予め定めた漸次変化に対応する函数に従って液送出手段(ポンプ)で送り出し，スタ

ディックミキサー中で混合する方法を用いることもできる。

ゲル形成液の粘度調整の方法として、ゲル形成液中のアガロース、水溶性ポリマー(例、水溶性セルロース誘導体、ポリアクリルアミド)の1種類又は2種類以上を所望の粘度になるような含有量で添加する方法が好ましい。この方法によりアクリルアミド系化合物の含有量の広い範囲にわたってゲル形成液の粘度を実質的に所望の一定値にすることができる。

高低濃度の2種類のゲル形成液の粘度は、約0℃から約80℃、通常約5℃から約50℃の温度範囲で、約1cP～約50cP、好ましくは約2cP～約20cPの範囲である。2種類のゲル形成液の粘度が実質的に等しい(又は実質的に一致する)とは、2種類の液の相互の粘度差が、混合する2種類の液の粘度の平均(算術平均)値を基準にして、その上下約12%以内、好ましくは約10%以内であることを意味する。ゲル形成液の粘度の測定方法としては、細管粘度計、落球粘度計、回転粘度計等公知のいずれの粘度計による測定方法を採用してもよい。粘度測定の際のゲル形成液の温度は約0℃から約80℃、通常約

5℃から約50℃の温度範囲で、2種類の液の混合部分及び/又はゲル形成部分での温度と実質的に同じ温度である。

ゲル媒体膜は、前述のようにして高低濃度の2種類のゲル形成液を混合して予め定められた漸次の濃度(アクリルアミド系化合物と架橋剤の含有量)の変化を有するゲル形成液を平面状支持体又はカバーシートの上に膜状又は層状に流延又は塗布し、分子状酸素の不存在下で、必要により紫外線又は可視光の照射及び/又は加熱して、単量体(アクリルアミド系化合物)と架橋剤とが架橋重合したポリアクリルアミド系水性ゲル媒体膜又は層として製造され用いられる。

角柱状又は円柱状(カラム状)のゲル媒体は、前述のようにして混合され予め定められた漸次の濃度の変化を有するゲル形成液を実質的に電気不伝導性で水不浸透性の平滑な内側表面のガラス管又は有機ポリマー管に充填し、分子状酸素の不存在下で、必要により紫外線又は可視光の照射及び/又は加熱して、単量体(アクリルアミド系化合物)と架橋剤とが架橋重合したポリアクリルアミド系水性ゲル媒体として製造され用いられる。

アクリルアミド系化合物(単量体)と架橋剤は、水溶液又は水分散液として水に溶解又は分散させておき、水中で両者を架橋重合させて、架橋重合した水性ゲル媒体を形成させる。本明細書においては特にことわらないかぎり、(水に)溶解と(水に)分散の両者を含めて単に(水に)溶解といい、水溶液と水分散液の両者を含めて単に水溶液という。溶媒又は分散媒としては、水だけでなく、所望により加えられる有機溶媒を含む水-有機溶媒混合物をも包含する。

ラジカル重合開始剤組成物としては「Electrophoresis」2(4), 213-219(1981), 同誌 2(4), 220-228(1981), 特開昭59-126236, 青木、永井編「最新電気泳動法」(1973年発行)等に記載の低温ラジカル重合開始剤組成物のうちから適宜に選択して用いることができる。ラジカル重合開始剤組成物の例として、 β -(ジメチルアミノ)プロピオニトリル(DMDPN)-ペルオクソ二硫酸アンモニウム混合物; N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)-ペルオクソ二硫酸アンモニウム混合物; TEMED-リボフラビン混合物; TEMED-リボフラビン-過酸化水素混合物; リボフラビン-ペルオクソ二

硫酸アンモニウム混合物; リボフラビン-過酸化水素混合物(リボフラビン等の光増感剤併用の場合には紫外線又は可視光の照射を併用する)等がある。ラジカル重合開始剤組成物の添加量は、単量体と架橋剤の合計重量に対して約0.3v%から約5.0v%, 好ましくは約0.5v%から約3.0v%の範囲である。

ゲル濃度としては S.Hjerten:「Archives of Biochemistry and Biophysics」1(Suppl.), 147-151(1982)に記載の定義に従って表示して、単量体、架橋剤および水からなるゲル媒体の容積に対して単量体と架橋剤の合計量が約3w/v%から約30w/v%の範囲で用いられる。

ゲル形成液を平面状支持体(又はカバーシート)の表面上で架橋重合させる際には、ゲル形成液の流延塗布とその後の架橋重合を窒素ガス雰囲気中等の分子状酸素の不存在下で実施するか、あるいは流延塗布したゲル形成液の表面上に直ちにカバー用フィルム、シート又は板等の被覆材料で覆い架橋重合させることが好ましい。この目的に使用される被覆材料としては前述の平面状支持体と同様な素材からなるものを用いることができる。力

パー用フィルムが有機ポリマーフィルムである場合、その厚さは約300 μ m以下であり、実用的な範囲としては約4 μ mから約200 μ m、好ましくは約4 μ mから約100 μ mである。被覆材料がガラス板の場合、その厚さは支持体として用いる平面状ガラス板と同様な厚さのものを用いることができる。また、サンプル注入部分の形状は、長方形状、正方形状、三角形状(シャークステース状)、円形状等 公知の形状から選択して設けることができる。

ゲル媒体膜の厚さは、一般に約50 μ mから約5mm、好ましくは約80 μ mから約1mmの範囲である。DNA等の核酸フラグメント分取に用いる場合には、厚さは約300 μ mから約3mmの範囲が好ましい。

円柱状のゲル媒体の直径は、一般に約3mmから約30mm、好ましくは約5mmから約20mmの範囲である。

本発明の方法で製造されるゲル媒体膜又は柱状のゲル媒体は前述の諸文献や特許明細書等に記載の公知の方法に従って、水平型及び垂直型スラブ電気泳動法、カラム電気泳動法、ディスク電気泳動法等に用いることができる。

以下余白

キセノン放電灯を照射して架橋重合させ、ついで形成されたゲル膜の上に 厚さ63 μ m、幅20cmの無色透明 PETシートをカバーシートとして密着積層して、一定膜厚800 μ mで 第1図に示したゲル濃度変化を有する濃度グラジエントポリアクリルアミド水性ゲル膜①(本発明)を調製した。

別に、第1表Bに記載の組成の粘度を一致させていない(相互の粘度値の差が2液の粘度値の算術平均値からそれぞれ20.7%) 2種類のゲル形成液を調製したほかは実施例1と同様に一定膜厚800 μ mで 第1図に示したゲル濃度変化を有する濃度グラジエントポリアクリルアミド水性ゲル膜②(比較例)を調製した。

ゲル膜①②の濃度勾配(第1図):

ゲル濃度最小(流延塗布始端側)6.0%からほぼ直線状に増加して最大(流延塗布終端側)20%。

以下余白

実施例1及び比較例1

表面を紫外線照射処理で親水性にした平滑表面の厚さ180 μ m、幅20cmの無色透明ポリエチレンテレフタレート(PET)シート(支持体)の長辺に沿った両縁辺部に一定厚さ800 μ m、幅10mmのスペーサー板を接着固定した。

一方、第1表Aに記載の組成の粘度をほぼ一致させ(相互の粘度値の差が2液の粘度値の算術平均値からそれぞれ1.8%)、濃度(アクリルアミドと架橋剤の含有量)の異なる2種類のゲル形成液を調製した。

2種類のゲル形成液(重合開始剤組成物未添加)を、特願昭62-129924に記載の方法に従い、第1図に示した塗布方向に20cmの長さにならってゲル濃度6.0%から20%まで 直線状の濃度勾配になるように漸次流量比を変化させながら(始めに低濃度ゲル形成液の比率を大きくし、徐々に高濃度ゲル形成液の比率を大きくした)、重合開始剤を添加しつつ、スタティックミキサーで2液を混合し、一定流量で流延塗布ヘッドに混合液を供給した。この混合液を一定流量で窒素ガス雰囲気中で前記のPET支持体の上に流延塗布し、ゲル形成液膜に500V

第1表 ゲル形成液の組成

成 分	A(実施例1)		B(比較例1)	
	低濃度液	高濃度液	低濃度液	高濃度液
アクリルアミド	54.9g	183.0g	54.9g	183.0g
1,3,5-トリクロロイソヘキストロ-s-トリジン	570mg	1800mg	570mg	1900mg
N-[[3-(ヒニカスホニル)プロピル]メチル]アクリルアミド-7-アクリルアミドコホリルアクリルアミド	4.5g	15.0g	4.5g	15.0g
(分子量約70万)	20.0g	16.0g	不添加	不添加
トリス(ヒドロキシメチル)アミン	1000mg	←	←	←
[pH緩衝剤]				
1.5M-Tris-塩酸(pH8.8)	250mL	←	←	←
水を加えて	1000mLにする	←	←	←
[重合開始剤]				
アゾビス(2-アミノプロピオン酸)2HCl(2.5%水溶液)	24mL	←	←	←
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(25%水溶液)	250 μ L	←	←	←
リチウム過硫酸塩Li ₂ S ₂ O ₈ Na ₂ 塩(0.25%水溶液)	20mL	←	←	←
粘度測定値(15℃)	13.7cP	14.2cP	2.1cP	3.2cP

図1: 左側欄と同じ数値及び単位

粘度測定値: 15℃で回転粘度計で測定

得られた2種のゲル膜の膜厚を流延方向に沿って測定したところ、本発明の粘度を一致させた2種類のゲル形成液を混合して調製した濃度グラジエントを有する膜厚一定のゲル膜①では、第2図Aに示したようにゲル濃度の増大に対して膜厚の変動範囲は予め定めた膜厚に対して最大約+1.0%、最小約-0.8%の範囲に収まっており、厚さの均一性は極めてすぐれていたが、粘度を一致させていない比較例のゲル膜②では、ゲル濃度の増大に対して膜厚の変動範囲は予め定めた膜厚に対して最大約+5.5%、最小約-1.3%の範囲に及んでおり、かつゲル濃度の増大につれて膜厚が増大する部分があり、厚さの均一性が悪いことが明らかになった。すなわち、本発明のゲル膜の膜厚の変動範囲は従来技術である比較例のゲル膜の膜厚の変動範囲の約1/4である。

性能評価試験

前記の2種類のゲル膜にサンプル注入口を設け、標準蛋白質として

α -ラクトアルブミン(分子量14400)

大豆トリプシンインヒビター(分子量20100)

カルボニックアンヒドラーゼ(分子量30000)

オバルブミン(分子量43000)

牛アルブミン(分子量67000)

ホスホリラーゼb(分子量94000)

を用いて常法に従い電気泳動分離分画を実施し、クーマシーブルー(Coomassie Blue)R-250で泳動像を染色した。

その結果本発明のゲル濃度グラジエントを有するゲル膜①の分画パターンは正常の一直線状でかつ分画パターンに乱れはなかった。これに対して従来技術である比較例のゲル濃度グラジエントを有するゲル膜②の分画パターンはW型の大きなうねり状で分画パターンに乱れがあった。

この結果から、本発明の粘度を実質的に一致させた濃度の異なる2種類のゲル形成液を混合する方法で調製した濃度グラジエントを有する膜厚一定のポリアクリルアミド水性ゲル電気泳動用媒体膜は、膜厚がきわめて一定で、かつ分画パターンに乱れないすぐれた電気泳動媒体膜であることが明らかになった。

4 図面の簡単な説明

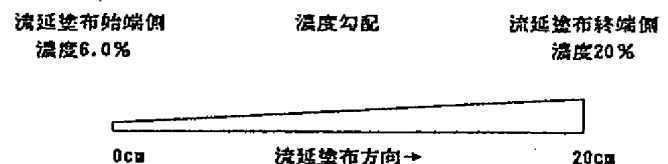
第1図は実施例1及び比較例1のゲル濃度グラジエントを有するポリアクリルアミド水性ゲル膜

の流延塗布方向(電気泳動方向でもある)に沿う漸次的なゲル濃度変化(濃度勾配又は濃度グラジエント)を示す断面模式図である。

第2図は実施例1及び比較例1のゲル濃度グラジエントを有するポリアクリルアミド水性ゲル膜の流延塗布方向に沿う厚さ変動の測定値を予め定めた膜厚(800 μ m)に対する変動パーセンテージで示した模式図である。Aは本発明のゲル膜①、Bは従来技術である比較例のゲル膜②の厚さ変動パーセンテージ曲線である。

特許出願人 富士写真フイルム株式会社

第1図



第2図

